

Гены, контролирующие синтез флавоноидных и меланиновых пигментов ячменя

О.Ю. Шоева¹✉, К.В. Стрыгина¹, Е.К. Хлесткина^{1, 2, 3}

¹ Федеральное исследовательское учреждение Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Федеральное исследовательское учреждение Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

Помимо зеленой окраски, обусловленной хлорофиллом, у ячменя зерно и вегетативные органы могут быть окрашены соединениями фенольной природы, такими как меланины и флавоноидные пигменты антоцианы и проантоцианидины. В связи с широкой биологической активностью данных соединений и их неокрашенных предшественников в отношении растений и человека в последнее время наблюдается повышенный интерес к изучению генов, определяющих окраску у растений. Наиболее изученной является система генов, участвующих в синтезе флавоноидных пигментов. С семидесятых годов прошлого века в геноме ячменя идентифицированы и локализованы как структурные гены, кодирующие ферменты метаболизма флавоноидов, так и регуляторные гены, определяющие тканеспецифическое накопление данных пигментов в тканях зерна, а также в вегетативных органах. К настоящему времени выделены нуклеотидные последовательности регуляторных генов *Ant1* и *Ant2*, определяющих накопление антоцианов в перикарпе зерна, гена *Ant28*, контролирующего биосинтез проантоцианидинов (конденсированных танинов) в семенной оболочке, а также генов *HvMpc2*, *HvMyc2*, *HvWD40*, определяющих накопление антоцианов в алейроновом слое зерновки ячменя. Менее изучена меланиновая окраска. Ввиду сложной структуры и устойчивости к различным растворителям химическая природа данных пигментов до сих пор не установлена. Однако благодаря сравнительному анализу транскриптомов в окрашенных и неокрашенных чешуях колоса и зерна почти изогенных линий ячменя удалось идентифицировать метаболические пути, лежащие в основе формирования меланиновой пигментации. В предложенной статье проводится обзор результатов работ, посвященных исследованиям генетического контроля формирования окраски у ячменя.

Ключевые слова: *Hordeum vulgare* L.; антоцианы; проантоцианидины; танины; меланины; флавоноиды.

Genes determining the synthesis of flavonoid and melanin pigments in barley

O.Yu. Shoeva¹✉, K.V. Strygina¹, E.K. Khlestkina^{1, 2, 3}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ N.I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

In addition to the green color caused by chlorophyll, grain and vegetative organs of barley can be colored by compounds of phenolic nature, such as melanins and flavonoids, which include anthocyanins, proanthocyanidins. Due to the wide biological activity of these pigmented compounds and their uncolored precursors in respect to plants and humans, there has recently been an increased interest in studying genes that determine pigmentation in plants. The gene network determining the synthesis of flavonoid pigments is the most studied one. Since the 1970s, structural genes that encode the enzymes of flavonoid metabolism, as well as regulatory genes that determine the tissue-specific accumulation of these pigments in grain tissues, as well as in vegetative organs have been identified and localized in the barley genome. The *Ant1* and *Ant2* genes, determining the accumulation of anthocyanins in grain pericarp, the *Ant28* gene controlling the biosynthesis of proanthocyanidins (condensed tannins) in seed coat, as well as the *HvMpc2*, *HvMyc2* and *HvWD40* genes responsible for the accumulation of anthocyanins in the aleurone layer of barley grain have been determined. Melanins are less studied pigments of plants. Due to the complex structure and resistance to various solvents, the chemical nature of these pigments has not been established. However, due to the comparative analysis of transcriptomes in the colored and uncolored lemma and grain pericarp of barley near-isogenic lines, it was possible to identify the metabolic pathways underlying the formation of the melanin pigmentation. The proposed article reviews the results of the studies on the genetic control of barley coloration.

Key words: *Hordeum vulgare* L.; anthocyanins; proanthocyanidins; tannins; melanins; flavonoids.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Шоева О.Ю., Стрыгина К.В., Хлесткина Е.К. Гены, контролирующие синтез флавоноидных и меланиновых пигментов ячменя. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(3):333-342. DOI 10.18699/VJ18.369

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Shoeva O.Yu., Strygina K.V., Khlestkina E.K. Genes determining the synthesis of flavonoid and melanin pigments in barley. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(3):333-342. DOI 10.18699/VJ18.369 (in Russian)

В определении окраски различных органов у ячменя (*Hordeum vulgare* L., $2n = 2x = 14$, HH) кроме основного пигмента растений, хлорофилла, участвуют две группы соединений фенольной природы: 1) флавоноиды, к которым относятся антоцианы и проантоцианидины, обуславливают красно-фиолетовую окраску вегетативных органов, а также голубую, фиолетовую и красно-коричневую пигментацию зерна ячменя (последнюю придают проантоцианидины) и 2) меланиновые пигменты, образуемые в результате окисления и полимеризации фенольных соединений, определяют черную окраску чешуй колоса и зерна (Harlan, 1914).

Перечисленные пигментированные соединения и их неокрашенные предшественники выполняют важные физиологические функции в жизни растений. Так, флавоноидные соединения влияют на рост и развитие растений, играют защитную роль при различных типах биотического и абиотического стресса, участвуют в поддержании состояния покоя семян (Debeaujon et al., 2000; Grotewold, 2006; Gould et al., 2009; Di Ferdinando et al., 2012; Khlestkina, 2013a), а меланиновая окраска вносит вклад в устойчивость злаковых растений к фузариозу колоса (Zhou et al., 1991; Choo et al., 2005; Loskutov et al., 2016).

К настоящему времени помимо важных функций, выполняемых фенольными соединениями в жизни растений, показана функциональная активность группы флавоноидных соединений для здоровья человека (Rice-Evans et al., 1996; Szajdek, Borowska, 2008; Тараховский и др., 2013). В частности, с потреблением антоцианов связывают уменьшение риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний, рака, а также возрастных нейродегенеративных заболеваний (Youdim et al., 2004; Reddivari et al., 2007; Hui et al., 2010; Mauray et al., 2012; Bunea et al., 2013; Strathearn et al., 2014). Насыщение съедобных частей растений, в том числе зерновок ячменя, антиоксидантными соединениями антоцианами является актуальной задачей.

Таким образом, в связи с широкой биологической активностью пигментированных фенольных соединений и их неокрашенных предшественников в последнее время наблюдается повышенный интерес к изучению генов, контролирующих синтез пигментов у растений.

В настоящем обзоре суммируются результаты классических и современных молекулярно-генетических исследований механизмов формирования признаков окраски ячменя, обусловленных флавоноидными и меланиновыми пигментами.

Флавоноидная пигментация у ячменя

У ячменя листовые пластинки, листовое влагалище, ушки листового влагалища, стебель, ости, жилки колосковой чешуи и основание растения могут иметь красно-фиолетовую антоциановую окраску (рис. 1, а) (Lundqvist, Franckowiak, 2003). Антоцианы могут синтезироваться в перикарпе и алейроновом слое зерна, придавая зерну фиолетовую и голубую окраски соответственно (Harlan, 1914; Adzhieva et al., 2016) (рис. 1, б). Химический состав антоцианов, синтезируемых в перикарпе и алейроновом слое, разный. В перикарпе преобладает цианидин-3-глюкозид, тогда как в алейроновом слое – дельфинидин-3-глюкозид

(Kim et al., 2007). Полимерные флавоноидные соединения проантоцианидины (конденсированные танины) могут синтезироваться в оболочке зерна ячменя, придавая зерну красно-коричневую окраску (Aastrup et al., 1984).

Исследование молекулярно-генетических основ биосинтеза флавоноидных соединений у ячменя было обусловлено потребностями пивоваренной промышленности. Известно, что проантоцианидины зерна ячменя вызывают нежелательное коллоидное помутнение пива, снижая, таким образом, его качество (von Wettstein, 2007). В связи с этим стояла задача изучить генетический контроль биосинтеза проантоцианидинов и получить пивоваренные сорта ячменя, не способные к их синтезу. Для этой цели в 70-х годах прошлого века с помощью химического мутагенеза было получено более 700 линий ячменя, несущих мутации в 30 *Ant* (*anthocyanin-less*) локусах, контролирующих биосинтез антоцианов и/или проантоцианидинов (Jende-Strid, 1993). Для некоторых из этих локусов была установлена функциональная роль, заключающаяся либо в контроле ферментативной активности, либо в регуляции транскрипционной активности генов, задействованных в биосинтезе (Jende-Strid, 1993).

Благодаря секвенированию генома ячменя (The International Barley Genome Sequencing Consortium, 2012), а также развитию методов сравнительной геномики, относительно недавно стало возможным идентифицировать многие недостающие компоненты системы генов, контролирующих окраску флавоноидной природы у ячменя, в том числе идентифицировать регуляторные гены, определяющие тканеспецифическое накопление пигментов.

Структурные гены биосинтеза флавоноидных соединений у ячменя

Биосинтез флавоноидов – один из самых полно охарактеризованных метаболических путей у растений (рис. 2) (Winkel-Shirley, 2001; Khlestkina, 2013b).

Предшественником всех флавоноидных соединений, включая антоцианы и проантоцианидины, является фенилаланин, который в результате активности ферментов фенилпропаноидного пути биосинтеза – фенилаланинаммияклизы (PAL), циннамат-4-гидроксилазы (C4H) и 4-кумарат:КоА лигазы (4CL) – преобразуется в КоА-эфир коричной кислоты. Это соединение далее подвергается последовательному преобразованию ферментами флавоноидного пути биосинтеза – халконсинтазой (CHS), халконфлаванонизомеразой (CHI), флаванон-3-гидроксилазой (F3H), цитохром P450-зависимыми монооксигеназами флавоноид-3'-гидроксилазой (F3'H) и/или флавоноид-3', 5'-гидроксилазой (F3'5'H) и дигидрофлавонол 4-редуктазой (DFR) – до лейкоантоцианидинов, которые с помощью лейкоантоцианидиндиоксигеназы/антоцианидинсинтазы (LDOX/ANS) преобразуются в антоцианидины. Далее ферменты, относящиеся к классам метилтрансфераз (MT), гликозилтрансфераз (GT) и ацилтрансфераз (AT), преобразуют антоцианидины в окрашенные антоцианы. Лейкоантоцианидины и антоцианидины являются также субстратами для лейкоантоцианидинредуктазы (LAR) и антоцианидинредуктазы (ANR), которые окисляют данные соединения до соответствующих флаван-3-олов (катехинов), которые в свою очередь с помощью неизвестных до

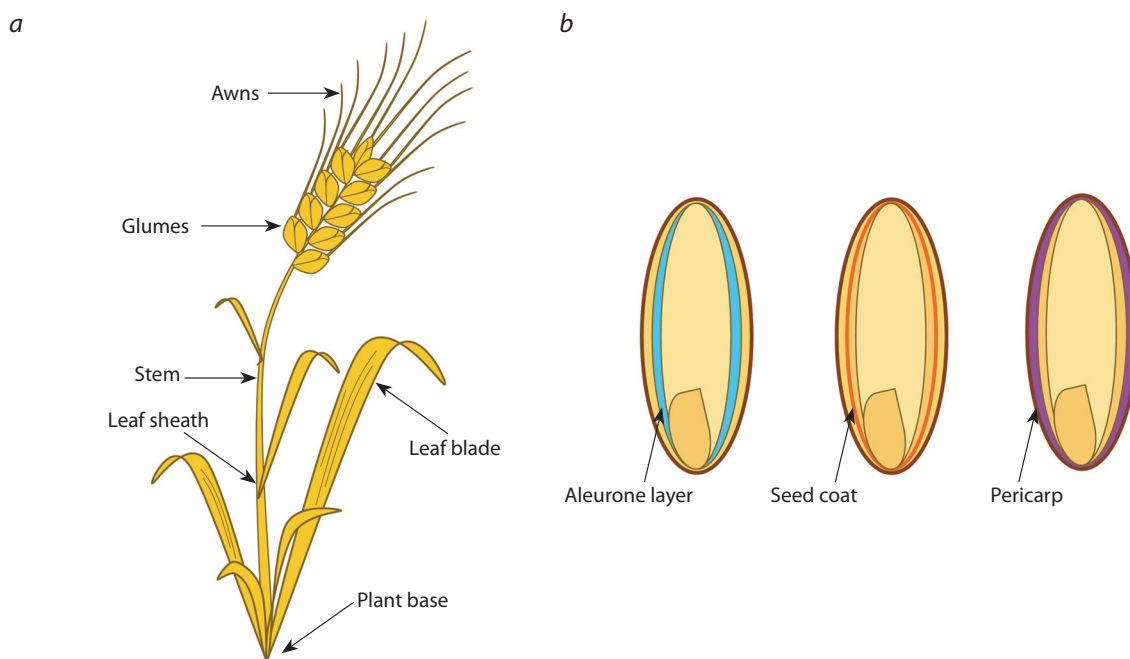


Fig. 1. Schematic image of barley tissues able to accumulate flavonoid pigments: (a) plant organs, (b) grain tissues.

Anthocyanins synthesized in the pericarp and aleurone layer color the grain purple and blue, respectively. Proanthocyanidins of the seed coat color the grain reddish-brown.

сих пор ферментов полимеризуются в проантоцианидины (конденсированные танины).

У ячменя основные структурные гены, кодирующие ферменты фенилпропаноидного и флавоноидного путей биосинтеза, были идентифицированы и локализованы в геноме (табл. 1).

Методом Саузерн-блот гибридизации в геноме ячменя идентифицировано пять копий гена *Pal*, а с помощью Нозерн-блот гибридизации показано, что все они экспрессируются в корнях проростков ячменя (Kervinen et al., 1997). Две тесно сцепленные копии гена *Pal* были картированы на хромосоме 2HL. BLAST-поиском в геноме ячменя идентифицированы дополнительные копии генов-кандидатов *Pal* на хромосомах 2HS, 6HL, 3HS (Peukert et al., 2013).

Четыре копии генов-кандидатов для *C4h* были найдены в геноме ячменя с помощью BLAST-поиска с известными нуклеотидными последовательностями *C4h* риса (Peukert et al., 2013). Одна копия была картирована на хромосоме 3HL, три другие локализованы в собранных контигах хромосом 7HL, 3HL, 1H (Peukert et al., 2013).

Гены *Chs* представлены в геноме ячменя в виде мультигенного семейства, содержащего семь копий (Christensen et al., 1998). Одна полноразмерная копия гена *Chs* была выделена с помощью Саузерн-блот гибридизации с использованием в качестве меченого зонда последовательности кДНК гена *Chs Antirrhinum majus* (Rohde et al., 1987, 1991). Другая копия *Chs* выделена из кДНК библиотеки, полученной из листьев ячменя после инокуляции патогенным грибом *Blumeria graminis* (Christensen et al., 1998). Копии гена *Chs* были картированы на хромосомах 1HS, 1HL и 6HS (Pecchioni et al., 1999; Peukert et al., 2013); нук-

леотидные последовательности, сходные с *Chs*, также были идентифицированы в собранных контигах хромосом 2HS, 2HL, 4HS и 6HL (Peukert et al., 2013). В геноме ячменя присутствует одна копия гена *Chi*, локализованная на хромосоме 5HL (Druka et al., 2003).

Ген *F3h* ячменя был выделен из кДНК библиотеки, полученной из перикарпа и оболочек зерна, с помощью Нозерн-блот гибридизации с использованием кДНК-пробы *F3h A. majus* (Meldgaard, 1992). Ген был картирован на хромосоме 2HL (Khlestkina et al., 2011; Peukert et al., 2013).

Одна копия гена *F3'h* была найдена в геноме ячменя по гомологии с нуклеотидной последовательностью гена *F3'h* кукурузы. Данная последовательность локализуется в контигах хромосомы 1H (Shoeva et al., 2016). Вторая копия *F3'h* обнаружена в коротком плече хромосомы 6H (Вихорев и др., 2018).

Четыре копии гена *F3'5'h* были выявлены в геноме ячменя на основе известных последовательностей *F3'5'h* двудольных видов растений (Strygina et al., 2017; Вихорев и др., 2018). Одна копия была картирована в хромосоме 4HL (*F3'5'h-1*), две – в хромосоме 6H (*F3'5'h-2* и *F3'5'h-3*) и одна в хромосоме 7H (*F3'5'h-4*). Для копии *F3'5'h-1* показана тканеспецифическая экспрессия в алейроновом слое зерновки окрашенных и неокрашенных линий ячменя (Strygina et al., 2017). Для *F3'5'h-4* была продемонстрирована активность во всех проанализированных слоях зерновки ячменя, а также в стеблях, контрастных по содержанию антоциановых пигментов (Вихорев и др., 2018).

Полноразмерная кодирующая нуклеотидная последовательность гена *Dfr* была выделена из библиотеки экспрессирующихся последовательностей EST зерна ячменя с использованием кДНК *Dfr* кукурузы в качестве зонда

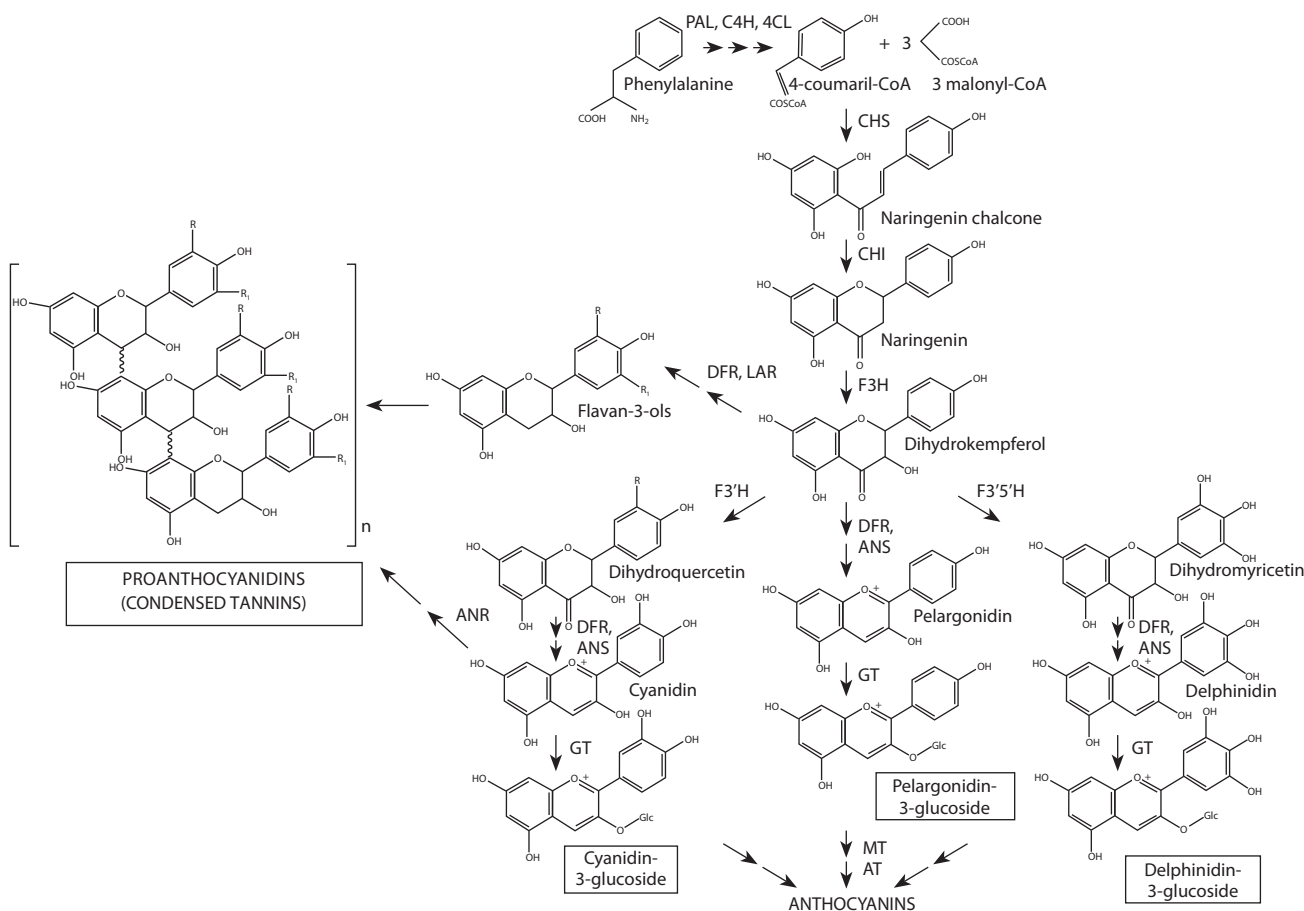


Fig. 2. Scheme of flavonoid pigment biosynthesis determining barley color.

Designations: 4CL, 4-coumarate-CoA ligase; ANR, anthocyanidin reductase; ANS (LDOX), anthocyanidin synthase (leucoanthocyanidine dioxygenase); AT, acetyltransferase; CHI, chalcone-flavanone isomerase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; CHS, chalcone synthase; DFR, dihydroflavonol 4-reductase; F3H, flavanone 3-hydroxylase; F3'H, flavonoid 3'-hydroxylase; F3'5'H, flavonoid 3',5'-hydroxylase; GT, glycosyltransferase; LAR, leucoanthocyanidin reductase; MT, methyltransferase; PAL, phenylalanine ammonia lyase. The scheme is based on the data reported by Winkel-Shirley (2001) and Khlestkina (2013b).

(Kristiansen, Rohde, 1991). Ген был картирован на длинном плече хромосомы 3Н (Peukert et al., 2013).

Одна копия гена *Ans* была обнаружена в контиге хромосомы 5НL ячменя (Shoeva et al., 2016). Вероятная нуклеотидная последовательность гена *Lar* была найдена в библиотеке экспрессирующихся последовательностей EST алгоритмом tBLASTn с использованием в качестве референсной аминокислотной последовательности LAR десмодиума (Bogs et al., 2005). Ген *Lar* до сих пор не локализован в геноме ячменя.

Полноразмерная нуклеотидная последовательность гена *Ufgt* была выделена из генома ячменя с помощью Саузерн-блот гибридизации с использованием нуклеотидной последовательности гена *Ufgt* кукурузы в качестве пробы. Ген был картирован на хромосоме 7HS (Wise et al., 1990). Нуклеотидные последовательности генов *4Cl* и *Anr* до сих пор не идентифицированы.

Регуляция биосинтеза флавоноидных пигментов

Регуляция экспрессии структурных генов биосинтеза флавоноидов осуществляется комплексом MBW, который образуют транскрипционные факторы (ТФ), принадлежащие к семействам с доменами MYB, bHLH/MYC и WD40

(Mol et al., 1998; Adzhieva et al., 2016). Разнообразие ТФ обуславливает высокую степень изменчивости окраски у растений. В настоящее время ведутся интенсивные работы по выявлению всех компонентов комплекса MBW, контролирующих формирование пигментации в различных органах, а также в тканях зерна ячменя.

Окраска алейронового слоя зерновки. Многие исследователи начала 20-го века полагали, что голубая пигментация алейронового слоя ячменя определяется одним локусом, обозначенным G.F.H. Buckley как *Bl* (Blue vs. white aleurone, *Bl bl*) (Buckley, 1930; Faris, 1955). Было показано, что данный локус сцеплен с геном, определяющим формирование вместо остей трехлопастных придатков (фурок) (*Hoods vs. awns, K k*), и находится в группе сцепления IV (хромосома 4Н) (Buckley, 1930; Robertson, 1933; Myler, Stanford 1942; Immer, Henderson 1943). Было продемонстрировано сцепление *Bl* с *Gl* (*Normal vs. glossy seedlings, Gl gl*) (Immer, Henderson, 1943) и с геном, определяющим устойчивость к мучнистой росе (*Resistance vs. susceptibility to race of mildew, Mlg mlg*) (Briggs, 1945). W.D. Hanson и H.H. Kramer (1949) выявили совместную наследуемость голубой окраски алейрона и одного из генов частичной стерильности.

Table 1. Structural and regulatory genes for barley flavonoid biosynthesis cloned and/or mapped hitherto

Gene	Number of identified copies*	Accession number of the sequenced fragment in NCBI and/or reference	Chromosomal/intrachromosomal locatio*
Structural genes			
<i>Pal</i>	5 (Kervinen et al., 1997)	Z49145–Z49147 (Kervinen et al., 1997)	2HL, 2HS, 6HL, 3HS, 1H (Peukert et al., 2013)
<i>C4h</i>	4 (Peukert et al., 2013)	(Peukert et al., 2013)	3HL, 3HS, 7HL, 1H (Peukert et al., 2013)
<i>Chs</i>	7 (Christensen et al., 1998)	X58339 (Rohde et al., 1991) Y09233 (Christensen et al., 1998)	1HS (Pecchioni et al., 1999) 1HL, 1HS, 6HS, 2HS, 2HL, 4HS, 6HL (Peukert et al., 2013)
<i>Chi</i>	1 (Druka et al., 2003)	AF474923 (Druka et al., 2003)	5HL (Druka et al., 2003)
<i>F3h</i>	1 (Meldgaard, 1992; Khlestkina et al., 2011)	X58138 (Meldgaard, 1992)	2HL (Khlestkina et al., 2011; Peukert et al., 2013)
<i>F3'h</i>	2 (Shoeва et al., 2016; Vikhorev et al., 2018)	(Shoeва et al., 2016)	1H (Shoeва et al., 2016) 6H (Vikhorev et al., 2018)
<i>F3'5'h</i>	4 (Strygina et al., 2017; Vikhorev et al., 2018)	MF679159–62 (Strygina et al., 2017)	4HL (Strygina et al., 2017) 6H, 7H (Vikhorev et al., 2018)
<i>Dfr</i>	1 (Kristiansen, Rohde, 1991)	S69616 (Kristiansen, Rohde, 1991)	3HL (Peukert et al., 2013)
<i>Ans</i>	1 (Shoeва et al., 2016)	(Shoeва et al., 2016)	5HL (Shoeва et al., 2016)
<i>Lar</i>	1 (Bogs et al., 2005)	BN000696 (Bogs et al., 2005)	–
<i>Ufgt</i>	1 (Wise et al., 1990)	X15694 (Wise et al., 1990)	7HS (Wise et al., 1990)
Regulatory genes			
bHLH/MYC	2, <i>Ant2/HvMyc1</i> (Cockram et al., 2010; Shoeва et al., 2016) <i>HvMyc2</i> (Strygina et al., 2017)	HM370298–387 (Cockram et al., 2010) KX035100 (Shoeва et al., 2016) MF679157–58 (Strygina et al., 2017)	2HL (Cockram et al., 2010) 4HL (Strygina et al., 2017)
MYB	3, <i>Ant1</i> (Himi, Taketa, 2015; Shoeва et al., 2015) <i>Ant28</i> (Himi et al., 2011) <i>HvMpc2</i> (Strygina et al., 2017)	(Himi, Taketa, 2015), KP265976–79 (Shoeва et al., 2015) MF679153–56 (Strygina et al., 2017)	7HS (Himi, Taketa, 2015) 3HL (Himi et al., 2011) 4HL (Strygina et al., 2017)
WD40	1, <i>HvWD40</i> (Strygina et al., 2017)	MF679149–52 (Strygina et al., 2017)	6HL (Strygina et al., 2017)

* References are shown in parentheses.

Первыми установили, что существует более одного фактора, определяющего голубую окраску алейронового слоя, J.L. Myler и Е.Н. Stanford (1942). Они показали, что при скрещивании любого из голубозерных сортов (Kwan, Algerian, Awnless) с неокрашенными сортами (Goldfoil, Hanna, Nepal) наследование признака голубой зерновки будет монофакторным. Присутствие второго комплементарного фактора (*B11 b11*) обнаружилось при скрещивании двух неокрашенных сортов Goldfoil × Nepal. В F₂ наблюдалось расщепление по фенотипу зерна – 9 голубые : 7 белые. Однако при скрещивании сортов Hanna и Goldfoil, имеющих неокрашенный алейроновый слой, все растения поколения F₁ имели неокрашенное зерно. Так, было показано, что необходим по меньшей мере один доминантный аллель в каждом локусе для проявления окраски алейрона. Генотипы растений, участвующих в этом исследовании, представлены в табл. 2.

J.L. Myler и Е.Н. Stanford (1942) показали, что *B11* сцеплен с геном, контролирующим пленчатость ячменя (Hulled vs. naked character, *N n*); данные факторы были локализованы в группе сцепления III (хромосома 7Н). Позже

F.N. Briggs также говорит о многофакторности определения такого признака, как голубой алейрон, однако дает им противоположное название: фактор генотипа Goldfoil обозначают как *B1*, а Nepal – *B11* (Briggs, 1945). Впоследствии фактор из хромосомы 4Н (Goldfoil) был переименован в *B11*, а фактор из хромосомы 7Н (Nepal) – в *B12* (Faris, 1955). В 1970 г. появляются данные о том, что *B12* располагается в прицентромерном районе хромосомы 7Н (Eslick, 1971).

К 1978 г. становится понятно, что голубой цвет алейрона зависит от пяти комплементарно действующих доминантных генов: *B11* (хромосома 4Н), *B12* (хромосома 7Н) и трех новых ранее неописанных генов *B13*, *B14* и *B15* (Finch, Simpson, 1978). Утверждается, что не известны ячмени с рецессивными аллелями более чем по одному локусу. При этом отмечается, что *B13* и *B14* тесно сцеплены с *B11*.

Для формирования окраски зерновки ячменя необходимо присутствие всех генов *B1* в доминантном состоянии (Finch, Simpson, 1978), за исключением гена *b14*, который в гомозиготном нефункциональном состоянии приводит к смене голубой окраски алейронового слоя на розовую. Свойствами, продемонстрированными *B14*, в пути био-

Table 2. The allelic states of factors determining aleurone layer color in barley varieties according to (Myler, Stanford, 1942)

Color aleurone layer	Variety	Factor 1	Factor 2
Blue	Kwan	<i>Bl Bl</i>	<i>Bl1 Bl1</i>
	Algerian	<i>Bl Bl</i>	<i>Bl1 Bl1</i>
	Awnless	<i>Bl Bl</i>	<i>Bl1 Bl1</i>
White	Goldfoil	<i>bl bl</i>	<i>Bl1 Bl1</i>
	Hanna	<i>bl bl</i>	<i>Bl1 Bl1</i>
	Nepal	<i>Bl Bl</i>	<i>bl1 bl1</i>

синтеза флавоноидов может обладать только один ген – *F3'5'H* (см. рис. 2), который был выделен позже (Strygina et al., 2017). В дополнение к выявленным новым локусам R.A. Finch и E. Simpson (1978) показали, что существует рецессивная энхансерная последовательность *en-Bl* (enhancer of blue and pink aleurone color, *ibl*) с неизвестным местоположением, при наличии которой происходит усиление интенсивности голубой или розовой окраски.

К настоящему времени гены *Bl* переименованы в *Blx* (Non-blue aleurone xenia), стало известно их точное положение: кластер генов *Blx1*, *Blx3* и *Blx4* локализуется в прицентромерном районе длинного плеча хромосомы 4Н, а *Blx2* – в прицентромерном районе хромосомы 7НL (Matthews et al., 2003).

МЫВ- и МЫС-факторы, регулирующие синтез антоцианов в алейроновом слое, и их связь с генами *Blx* долгое время были не известны. В исследовании (Strygina et al., 2017) аннотированы гены, кодирующие ТФ МЫС, МЫВ и WD40, регулирующие биосинтез антоцианов в алейроне. Эти гены были обозначены: *HvMyc2* (4HL), *HvMpc2* (4HL) и *HvWD40* (6HL). *HvMyc2* экспрессируется только в клетках алейрона, вне зависимости от окраски ткани. Для данного гена была выявлена точечная мутация сдвига рамки считывания, распространенная среди неокрашенных образцов сибирских и немецких коллекций ячменя. В отличие от тканеспецифического *HvMyc2*, экспрессия гена *HvMpc2* наблюдалась в разных тканях, однако его активность не детектировалась в неокрашенном алейроне по сравнению с окрашенным. Консервативный ген *HvWD40*, необходимый компонент регуляторного комплекса MBW, отличался постоянным уровнем экспрессии в цветных и неокрашенных тканях без какой-либо тканеспецифичности. *HvMyc2* вместе с *HvF3'5'h* (см. выше) были точно картированы в позиции кластера *Blx* в длинном плече хромосомы 4Н (Matthews et al., 2003; Strygina et al., 2017), тем самым они стали кандидатами для двух из трех тесно сцепленных генов *Blx*.

Окраска перикарпа зерновки. Проявление фиолетовой окраски зерна ячменя впервые описано в 1907 г. (Biffen, 1907). На основании расщепления 3:1 в популяции F_2 показано, что фиолетовый цвет цветочных чешуй является доминантным признаком, ассоциированным с фиолетовой окраской зерновки. J.L. Myler и E.H. Stanford (1942) при работе с голозерными ячменями (генотип *PP Bl1Bl1 Bl2Bl2*, где *Pp* – Purple vs. colorless grain) показали, что цвет перикарпа – это однофакторный признак. В исследовании R.W. Woodward и J.W. Thieret (1953) впервые

продемонстрировано, что два фактора определяют окраску перикарпа; авторы наблюдали расщепление 3:1 потомства F_2 при скрещивании ячменей с фиолетовым и неокрашенным зерном и расщепление 9:7 при скрещивании двух неокрашенных родителей. Факторы были обозначены как *Pp* и *Cc*. Те же авторы обнаружили, что локус *Pp* тесно сцеплен с геном *Vv*, контролирующим двурядность (Two-row vs. six-row spike, позднее *Vrs1*). Гены *Pp* и *Cc* были локализованы в группах сцепления I и II (хромосомы 2Н и 1Н) соответственно. Позже было показано, что *Pp* тесно сцеплен с факторами *Pcpc* (Purple vs. white veined lemma), *Plpl* (Purple vs. white chaff color), *Rr* (Red vs. white pericarp), *Re2 re2* (Red vs. white pericarp), контролирующими пигментацию чешуй и перикарпа (Faris, 1955; Jia et al., 2016). К настоящему времени *Cc* и *Pp* переименованы в *Pre1* и *Pre2* (Red lemma and pericarp, синоним *Re2* – Red lemma and pericarp 2, Purple lemma and pericarp) соответственно. Данные факторы контролируют развитие признака фиолетовой окраски цветковой чешуи и перикарпа ячменя (Frankowiak et al., 1997; Matthews et al., 2003).

Связь локусов *Pre2* и *Ant2* (Anthocyanin-less 2, синоним *Pr* – Purple straw) была установлена в работе Q. Jia с коллегами (2016). Ими продемонстрировано, что *Pre2* на хромосоме 2НL тесно сцеплен с микросателлитным маркером HvOs04g47170, который в свою очередь сцеплен с *Ant2* (0.1 cM между HvOs04g47170 и *Ant2*), кодирующим транскрипционный фактор с доменом bHLH (Cockram et al., 2010). Авторы провели анализ шести генов около маркера HvOs04g47170, однако ни один из этих генов, кроме *Ant2*, не показал ассоциации с окраской ушек, остей и жилок чешуй колоса. Кроме этого, выявлено, что в области 0.57 cM нет других генов-кандидатов, определяющих антоциановую окраску проанализированных органов. Результаты позволяют предположить, что *Pre2* и *Ant2* – это один и тот же ген, кодирующий транскрипционный фактор с bHLH доменом. Были определены мутации в гене *Ant2*, определяющие отсутствие окраски перикарпа. J. Cockram с коллегами (2010) идентифицировали делецию длиной 16 п. н. в шестом экзоне гена *Ant2*, приводящую к преждевременной термации трансляции у неокрашенных генотипов, а О.У. Shoeva с коллегами (2016) детектировали мутацию в регуляторной области гена, которая, предположительно, привела к снижению экспрессии гена *Ant2* почти в 17 раз в неокрашенном перикарпе сорта Bowman по сравнению с его почти изогенной линией PLP (NGB22213, the Nordic Genetic Resource Center) с фиолетовым перикарпом.

Второй компонент (*Pre1*), контролирующий формирование фиолетовой окраски зерна, локализованный на хромосоме 1Н, не известен. Однако показан вклад в формирование признака фиолетовой окраски зерна гена *Ant1*, картированного в коротком плече хромосомы 7Н (Briggs, 1945; Fedak et al., 1972; Barley, BinMap, 2005). *Ant1* кодирует ТФ с R2R3 MYB-доменом и регулирует биосинтез антоцианов в листовом влагалище, стебле и основании растения (Himi, Taketa, 2015; Shoeva et al., 2015). На основе почти изогенной линии PLP с фиолетовым перикарпом, несущей доминантные аллели генов *Ant1* (7HS) и *Ant2* (2HL), были получены две линии с различными комбинациями аллелей данных генов: *Ant1Ant1 ant2ant2* и *ant1ant1 Ant2Ant2* (Kukoeva et al., 2016), которые в отличие от родительской линии PLP (*Ant1Ant1 Ant2Ant2*) не имели окраски перикарпа. Анализ транскрипционной активности гена *Ant2* в перикарпе полученных линий выявил, что максимальный уровень экспрессии наблюдается у родительской линии PLP (*Ant1Ant1 Ant2Ant2*), тогда как у линии *ant1ant1 Ant2Ant2* – пониженная транскрипция гена, а в перикарпе линии *Ant1Ant1 ant2ant2* ген *Ant2* не экспрессировался. Таким образом, было показано, что в присутствии доминантного аллеля гена *Ant1* происходит усиление транскрипции гена *Ant2*, что подразумевает влияние (прямое или опосредованное) белкового продукта гена *Ant1* на транскрипцию гена *Ant2*.

Окраска вегетативных органов. Существуют сведения, что мутации в локусе *Ant1* нарушают биосинтез антоцианов не только в перикарпе зерновки, но также в стебле, листовом влагалище, ушках листового влагалища, остях и колосковых чешуях (Jende-Strid, Lundqvist, 1978; Francowiak, Lundqvist, 2012). Мутации в локусе *Ant2* приводят к отсутствию пигментации во всех вегетативных органах, включая вышеперечисленные части растения (Jende-Strid, Lundqvist, 1978). Эти данные указывают на то, что *Ant1* и *Ant2* совместно участвуют в формировании не только окраски перикарпа, но и вегетативных органов. С помощью полногеномного анализа ассоциаций (Genome-Wide Association Studies, GWAS) была показана связь гена *Ant2* с окраской ушек листовых влагалищ, чешуй колоса и остей. При этом наблюдалась экспрессия гена *Ant2* как в окрашенных, так и неокрашенных органах (Cockram et al., 2010).

Полученные в исследовании (Kukoeva et al., 2016) линии ячменя с различными комбинациями аллелей генов *Ant1* и *Ant2* позволяют оценить вклад каждого из этих генов в формирование окраски не только перикарпа, но и листового влагалища. В отличие от окраски перикарпа, для формирования которой необходимо присутствие обоих генов в доминантном состоянии, окраска листового влагалища обнаруживалась у линий, несущих ген *Ant1* в доминантном состоянии, тогда как *Ant2* мог быть как в доминантном, так и в рецессивном состоянии. Эти наблюдения указывают на ключевую роль гена *Ant1* в формировании антоциановой пигментации листового влагалища, тогда как для *Ant2* предполагается модулирующая роль.

Нами проведен анализ экспрессии структурных генов (*Chs*, *Chi*, *F3h*, *F3'h*, *Dfr*, *Ans*) в перикарпе и в листовом влагалище почти изогенных линий ячменя (Shoeva et al., 2015, 2016). Если в перикарпе все гены координировались

совместно в присутствии *Ant1* и *Ant2*, то в листовом влагалище наблюдался другой паттерн экспрессии генов: *Chs* экспрессировался как в окрашенном, так и неокрашенном антоцианами листовом влагалище, тогда как остальные структурные гены координировались совместно лишь в окрашенном листовом влагалище (Shoeva et al., 2015).

Таким образом, возможно, что одни и те же участники MBW комплекса по-разному взаимодействуют друг с другом в разных тканях, определяя тканеспецифические особенности регуляции структурных генов биосинтеза антоцианов.

Проантоцианидины оболочки зерна ячменя. С одной стороны, проантоцианидины – нежелательные соединения для пивоваренных сортов ячменя, поскольку они связываются с белками и образуют коллоидное помутнение пива, снижая его качество (von Wettstein, 2007). С другой стороны, эти соединения, накапливаемые в оболочке зерна, препятствуют преждевременному прорастанию зерна на корню и участвуют в поддержании состояния покоя зерна (Debeaujon et al., 2000; Himi et al., 2011). В связи с этим существовала потребность в исследовании генетического контроля биосинтеза проантоцианидинов в зерне ячменя, для того чтобы в дальнейшем использовать эти данные для получения сортов ячменя для конкретных целей.

Из коллекции мутантных линий ячменя, несущих мутации в локусах *Ant*, была выделена линия *ant28ant28*, характеризующаяся отсутствием проантоцианидинов в оболочке зерна, тогда как биосинтез антоцианов в вегетативных тканях не был нарушен. Активность ферментов DFR и LAR (см. рис. 2), необходимых для биосинтеза проантоцианидинов, у линии *ant28ant28* была снижена (Jende-Strid, 1993). Предполагается, что *Ant28* может кодировать регуляторный фактор, тканеспецифически контролирующий биосинтез проантоцианидинов (Himi et al., 2011). На основе сходства с нуклеотидными последовательностями генов *R-1/Tamyb10*, определяющих красную окраску зерна у пшеницы, выделена нуклеотидная последовательность *Hvmyb10* ячменя. Этот ген кодирует транскрипционный фактор с R2R3-MYB доменом и имеет высокий уровень сходства не только с генами *Tamyb10* пшеницы, но также с геном *TT2*, который совместно с генами *TT8* (bHLH) и *TTG* (WD40) контролирует биосинтез проантоцианидинов в зерне арабидопсиса (Nesi et al., 2001). У шести мутантных линий ячменя с нарушенным биосинтезом проантоцианидинов обнаружена мутация, приводящая к образованию преждевременного стоп-кодона. Разработанные на основе данного полиморфизма праймеры были использованы для картирования *Hvmyb10*, который локализуется с локусом *Ant28* в дистальном районе хромосомы 3HL (Himi et al., 2011). Таким образом, контроль биосинтеза проантоцианидинов осуществляется специфическим регуляторным фактором, не связанным с биосинтезом антоцианов. Остальные компоненты MBW комплекса, контролирующего синтез проантоцианидинов, еще не открыты.

Меланиновая пигментация у ячменя

Зерно и чешуи колоса ячменя могут иметь черную окраску, которая обусловлена меланинами (Harlan, 1914). Химическая природа данных пигментов до сих пор не установлена

из-за их сложной структуры и устойчивости к различным растворителям (Jana, Mukherjee, 2014). С помощью сравнительного анализа экспрессии структурных генов биосинтеза флавоноидов у почти изогенных линий ячменя, отличающихся окраской перикарпа зерна, показано, что черная окраска не связана с биосинтезом флавоноидов (Shoeva et al., 2016).

Образование черной окраски чешуй колоса и перикарпа зерна ячменя контролируется моногенно локусом *Blp1*, расположенным на хромосоме 1HL (Buckley, 1930; Franckowiak et al., 1997). Описаны три доминантных аллеля *Blp1.b* (*B*), *Blp1.mb* (*B^{mb}*) и *Blp1.g* (*B^g*), определяющих насыщенный черный, темный и серый цвет зерна ячменя соответственно (Woodward, 1941, 1942; Franckowiak et al., 1997).

Ввиду легкой идентификации меланиновой пигментации зерна ячменя, обнаруживаемой визуально, локус *Blp1* нанесен на многие разработанные молекулярно-генетические карты как морфологический маркер. Так, J.M. Costa с коллегами (2001) картировали локус на хромосоме 1H в позиции 129.5 cM в популяции удвоенных гаплоидов ячменя Oregon Wolfe между AFLR маркерами, ограничивающими район 126.3–132.0 cM.

Позднее локус *Blp1* был картирован на молекулярно-генетической карте хромосомы 1H, разработанной на основе популяции рекомбинантных инбредных линий, полученных в результате скрещивания сорта Haguna Nijo (белое зерно) с диким ячменем *H. vulgare* ssp. *spontaneum* H602 (черное зерно). Маркер *Blp1* был локализован в позиции 201.6 cM между EST маркерами, ограничивающими район 188.2–201.6 cM (Hori et al., 2005).

С помощью картирующей F₂ популяции Cheri (желтое зерно) × ICB181160 (черное зерно) локус *Blp1* был локализован между CAPS маркерами CAPS026 и CAPS030, ограничивающими район в 10 cM, где предсказано около 100 генов (Bungartz et al., 2016).

Предприняты попытки сузить район локализации гена *Blp1*. Используя метод секвенирования локус-специфичных ампликонов (SLAF-seq, Specific-locus amplified fragment sequencing), Q. Jia с коллегами (2017) последовательно разработали вложенные SNP маркеры и провели анализ сцепления данных маркеров с *Blp1* в картирующей популяции F₂ Hativei No.1 (черное зерно) × Zhe5819 (белое зерно). В результате район локализации *Blp1* был сужен с 5.68 до 1.66 млн п. н. На физической карте в данном районе идентифицировано 40 генов-кандидатов.

При использовании массового сегрегационного анализа (bulk segregant analysis, BSA) и полногеномного секвенирования транскриптома молекулярно-генетическая карта, разработанная на основе популяции удвоенных гаплоидов ячменя Haguna Nijo × H602, была насыщена маркерами EST. Проведенный QTL-анализ позволил сузить район локализации *Blp1* до 500 тыс. п. н. (Hisano et al., 2017).

До сих пор ген *Blp1*, контролирующий формирование черной окраски зерна ячменя, не выделен, не известны также его ортологи у других видов растений. Однако с помощью сравнительного анализа библиотек экспрессирующихся последовательностей из чешуй колоса и перикарпа зерна почти изогенных линий ячменя Bowman

(белое зерно) и BLP (NGB20470, черное зерно) показано, что признак меланиновой окраски зерна и чешуй колоса контролируется генной сетью, включающей 957 генов. Из них имеют повышенный уровень экспрессии: у линии BLP с черной окраской зерна – 623, а у неокрашенного сорта Bowman – 325 генов (Glagoleva et al., 2017). Анализ генов с дифференциальной экспрессией позволил предположить метаболические пути, определяющие биосинтез меланиновых пигментов, среди которых наиболее вероятными являются пути биосинтеза суберина, кутина, кутикулярных восков – липофильных компонентов клеточной стенки.

Заключение

К настоящему времени накоплен большой объем знаний о генетическом контроле биосинтеза пигментов у ячменя. Наиболее полно на генетическом уровне изучен метаболизм флавоноидных соединений. Открыты основные компоненты генетической сети биосинтеза флавоноидов, а также особенности ее регуляции в различных тканях. Дальнейшее исследование обнаруженного взаимодействия между регуляторными генами в совокупности с уже имеющимися данными позволит реконструировать полную генетическую регуляторную сеть биосинтеза флавоноидных соединений у ячменя, что откроет широкие возможности для контролируемого получения сортов ячменя с заданными свойствами.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Federation for Basic Research, project 16-34-60052.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Aastrup S., Outtrup H., Erdal K. Location of the proanthocyanidins in the barley grain. Carlsberg Res. Commun. 1984;49:105-109. DOI 10.1007/BF02913969.
- Adzhieva V.F., Babak O.G., Shoeva O.Y., Kilchevsky A.V., Khlestkina E.K. Molecular genetic mechanisms of the development of fruit and seed coloration in plants. Russ. J. Genet. Appl. Res. 2016;6(5): 537-552. DOI 10.1134/S2079059716050026.
- Barley, BinMap 2005. GrainGenes Map Data Report. Available at: <http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/graingenes/report.cgi?class=map&ata&name=Barley,+BinMap+2005>.
- Biffen R.H. The hybridisation of barleys. J. Agric. Sci. 1907;2(2):183-206. DOI 10.1017/S0021859600001271.
- Bogs J., Downey M.O., Harvey J.S., Ashton A.R., Tanner G.J., Robinson S.P. Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. Plant Physiol. 2005; 139(2):652-663. DOI 10.1104/pp.105.064238.
- Briggs F.N. Linkage relations of factors for resistance to mildew in barley. Genetics. 1945;30(2):115-118.
- Buckley G.F.H. Inheritance in barley with special reference to the color of caryopsis and lemma. Sci. Agric. 1930;10(7):460-492. DOI 10.4141/sa-1930-0021.
- Bunea A., Rugină D., Sconța Z., Pop R.M., Pintea A., Socaciu C., Tăbăran F., Grootaert C., Struijs K., VanCamp J. Anthocyanin determination in blueberry extracts from various cultivars and their anti-proliferative and apoptotic properties in B16-F10 metastatic murine melanoma cells. Phytochemistry. 2013;95:436-444. DOI 10.1016/j.phytochem.2013.06.018.

- Bungartz A., Klaus M., Mathew B., Léon J., Naz A.A. Development of new SNP derived cleaved amplified polymorphic sequence marker set and its successful utilization in the genetic analysis of seed color variation in barley. *Genomics*. 2016;107(2):100-107. DOI 10.1016/j.ygeno.2015.12.007.
- Choo T.M., Vigier B., Ho K.M., Ceccarelli S., Grando S., Franckowiak J.D. Comparison of black, purple, and yellow barleys. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 2005;52(2):121-126. DOI 10.1007/S10722-003-3086-4.
- Christensen A.B., Gregersen P.L., Schröder J., Collinge D.B. A chalcone synthase with an unusual substrate preference is expressed in barley leaves in response to UV light and pathogen attack. *Plant Mol. Biol.* 1998;37(5):849-857.
- Cockram J., White J., Zuluaga D.L., Smith D., Comadran J., Macaulay M., Luo Z., Kearsley M.J., Werner P., Harrop D., Tapsell C., Liu H., Hedley P.E., Stein N., Schulte D., Steuernagel B., Marshall D.F., Thomas W.T., Ramsay L., Mackay I., Balding D.J., The AGOUEB Consortium, Waugh R., O'Sullivan D.M. Genome-wide association mapping to candidate polymorphism resolution in the unsequenced barley genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010;107(50):21611-21616. DOI 10.1073/pnas.1010179107.
- Costa J.M., Corey A., Hayes P.M., Jobet C., Kleinhofs A., Kopisch-Obusch A., Kramer S.F., Kudrna D., Li M., Riera-Lizarazu O., Sato K., Szucs P., Toojinda T., Vales M.I., Wolfe R.I. Molecular mapping of the Oregon Wolfe Barleys: a phenotypically polymorphic doubled-haploid population. *Theor. Appl. Genet.* 2001;103(2-3):415-424.
- Debeaujon I., Léon-Kloosterziel K.M., Koornneef M. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2000;122:403-414. DOI https://doi.org/10.1104/pp.122.2.403.
- Di Ferdinando M., Brunetti C., Fini A., Tattini M. Flavonoids as antioxidants in plants under abiotic stresses. Ed. P. Ahmad, M.N.V. Prasad. *Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism, Productivity and Sustainability*. N. Y.: Springer, 2012;159-179. DOI 10.1007/978-1-4614-0634-1_9.
- Druka A., Kudrna D., Rostoks N., Brueggeman R., von Wettstein D., Kleinhofs A. Chalcone isomerase gene from rice (*Oryza sativa*) and barley (*Hordeum vulgare*): physical, genetic and mutation mapping. *Gene*. 2003;302:171-178. DOI 10.1016/S0378-1119(02)01105-8.
- Eslick R.F. Balanced male steriles and dominant pre-flowering selective genes for use in hybrid seed production. *Barley Genetics II*. 1971; 292-297.
- Faris D.G. Physiology and genetics of the kernel color of barley. Doctoral dissertation, University of British Columbia, 1955.
- Fedak G., Tsuchiya T., Helgason S.B. Use of monotelotrisomics for linkage mapping in barley. *Can. J. Genet. Cytol.* 1972;14:949-957. DOI 10.1139/g72-117.
- Finch R.A., Simpson E. New colours and complementary colour genes in barley. *Z. Pflanzenzüchtg.* 1978;81:40-53.
- Franckowiak J.D., Lundqvist U. Descriptions of barley genetic stocks for 2012. *Barley Genet. Newsl.* 2012;42:36-173.
- Franckowiak J.D., Lundqvist U., Konishi T. New and revised descriptions of barley genes. *Barley Genet. Newsl.* 1997;26:22-516.
- Glagoleva A., Shmakov N., Shoeva O., Vasiliev G., Shatskaya N., Börner A., Afonnikov D.A., Khlestkina E.K. Metabolic pathways and genes identified by RNA-seq analysis of barley near-isogenic lines differing by allelic state of the *Black lemma and pericarp (Blp)* gene. *BMC Plant Biol.* 2017;17(1):182. DOI 10.1186/s12870-017-1124-1.
- Gould K., Davies K.M., Winefield C. Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, and Applications. N. Y. Media: Springer Science & Business, 2009.
- Grotewold E. The Science of Flavonoids. N. Y.: Springer, 2006.
- Hanson W.D., Kramer H.H. The genetic analysis of two chromosome interchanges in barley from F₂ data. *Genetics*. 1949;34(6):687-700.
- Harlan H.V. Some distinctions in our cultivated barleys with reference to their use in plant breeding. *US Dept. Agric. Bul.* 1914;137:38. DOI 10.5962/bhl.title.109258.
- Himi E., Taketa S. Isolation of candidate genes for the barley *Ant1* and wheat *Rc* genes controlling anthocyanin pigmentation in different vegetative tissues. *Mol. Genet. Genomics*. 2015;290(4):1287-1298. DOI 10.1007/s00438-015-0991-0.
- Himi E., Yamashita Y., Haruyama N., Yanagisawa T., Maekawa M., Taketa S. *Ant28* gene for proanthocyanidin synthesis encoding the R2R3 MYB domain protein (*Hvmyb10*) highly affects grain dormancy in barley. *Euphytica*. 2011;188(1):141-151. DOI 10.1007/s10681-011-0552-5.
- Hisano H., Sakamoto K., Takagi H., Terauchi R., Sato K. Exome QTL-seq maps monogenic locus and QTLs in barley. *BMC Genomics*. 2017;18(1):125. DOI 10.1186/s12864-017-3511-2.
- Hori K., Kobayashi T., Sato K., Takeda K. QTL analysis of Fusarium head blight resistance using a high-density linkage map in barley. *Theor. Appl. Genet.* 2005;111(8):1661-1672. DOI 10.1007/s00122-005-0102-4.
- Hui C., Bin Y., Xiaoping Y., Long Y., Chunye C., Mantian M., Wenhua L. Anticancer activities of an anthocyanin-rich extract from black rice against breast cancer cells in vitro and in vivo. *Nutr. Cancer*. 2010;62:1128-1136. DOI 10.1080/01635581.2010.494821.
- Immer F.R., Henderson M.T. Linkage studies in barley. *Genetics*. 1943; 28(5):419-440.
- Jana B.K., Mukherjee S.K. Notes on the distribution of phytomelanin layer in higher plants – a short communication. *J. Pharmaceutical Biol.* 2014;4:131-132.
- Jende-Strid B. Genetic control of flavonoid biosynthesis in barley. *Hereditas*. 1993;119:187-204. DOI 10.1111/j.1601-5223.1993.00187.x.
- Jende-Strid B., Lundqvist U. Diallelic tests of anthocyanin-deficient mutants. *Barley Genet. Newsl.* 1978;8:57-59.
- Jia Q., Wang J., Zhu J., Hua W., Shang Y., Yang J., Liang Z. Toward identification of black lemma and pericarp gene *Blp1* in barley combining bulked segregant analysis and specific-locus amplified fragment sequencing. *Front. Plant Sci.* 2017;8:1414. DOI 10.3389/fpls.2017.01414.
- Jia Q., Zhu J., Wang J., Yang J., Zhang G. Genetic mapping and molecular marker development for the gene *Pre2* controlling purple grains in barley. *Euphytica*. 2016;208:215-223. DOI 10.1007/s10681-015-1593-y.
- Kervinen T., Peltonen S., Utriainen M., Kangasjarvi J., Teeri T.H., Karjalainen R. Cloning and characterization of cDNA clones encoding phenylalanine ammonia-lyase in barley. *Plant Sci.* 1997;123(1):143-150. DOI 10.1016/S0168-9452(96)04570-0.
- Khlestkina E.K. The adaptive role of flavonoids: emphasis on cereals. *Cereal Res. Commun.* 2013a;41:185-198. DOI 10.1556/CRC.2013.0004.
- Khlestkina E.K. Genes determining the coloration of different organs in wheat. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2013b;3(1):54-65. DOI 10.1134/S2079059713010085.
- Khlestkina E., Salina E., Matthies I., Leonova I., Börner A., Röder M. Comparative molecular marker-based genetic mapping of flavanone 3-hydroxylase genes in wheat, rye and barley. *Euphytica*. 2011;179:333-341. DOI 10.1007/s10681-010-0337-2.
- Kim M.J., Hyun J.N., Kim J.A., Park J.C., Kim M.Y., Kim J.G., Lee S.J., Chun S.C., Chung I.M. Relationship between phenolic compounds, anthocyanins content and antioxidant activity in colored barley germplasm. *J. Agric. Food Chem.* 2007;55:4802-4809. DOI 10.1021/jf0701943.
- Kristiansen K.N., Rohde W. Structure of the *Hordeum vulgare* gene encoding dihydroflavonol-4-reductase and molecular analysis of *ant18* mutants blocked in flavonoid synthesis. *Mol. Gen. Genet.* 1991; 230:49-59. DOI 10.1007/BF00290650.
- Kukoeva T., Gordeeva E., Glagoleva A., Shoeva O., Börner A., Khlestkina E. Purple-grained barley: marker-assisted development of NILs and genetic dissection. *Proc. of the 1st Int. Workshop "Plant Genetics and Genomics for Food Security"*. Novosibirsk, 26-28 August 2016. Novosibirsk, 2016;29.
- Loskutov I.G., Blinova E.V., Gavrilova O.P., Gagkaeva T.Y. The valuable characteristics of oats genotypes and resistance to *Fusarium* dis-

- ease. Russ. J. Genet. Appl. Res. 2016;20(3):286-294. DOI 10.18699/VJ16.151.
- Lundqvist U., Franckowiak J.D. Diversity of barley mutants. Eds. R. von Bothmer, T. van Hintum, H. Knüpfner, K. Sato. Diversity in barley (*Hordeum vulgare*). Amsterdam: Elsevier, 2003;77-96.
- Matthews D.E., Carollo V.L., Lazo G.R., Anderson O.D. GrainGenes, the genome database for small-grain crops. Nucleic Acids Res. 2003;31(1):183-186. DOI 10.1093/nar/gkg058.
- Mauray A., Felgines C., Morand C., Mazur A., Scalbert A., Milenkovic D. Bilberry anthocyanin-rich extract alters expression of genes related to atherosclerosis development in aorta of apo E-deficient mice. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 2012;22(1):72-80. DOI 10.1016/j.numecd.2010.04.011.
- Meldgaard M. Expression of chalcone synthase, dihydroflavonol reductase, and flavanone-3-hydroxylase in mutants of barley deficient in anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis. Theor. Appl. Genet. 1992;83:695-706.
- Mol J., Grotewold E., Koes R. How genes paint flowers and seeds. Trends Plant Sci. 1998;3:212-217.
- Myler J.L., Stanford E.H. Color inheritance in barley. J. Am. Soc. Agron. 1942;34:427-436.
- Nesi N., Jond C., Debeaujon I., Caboche M., Lepiniec L. The *Arabidopsis* TT2 gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. Plant Cell. 2001;13(9):2099-2114. DOI 10.1105/TPC.010098.
- Pecchioni N., Vale G., Toubia-Rahme H., Faccioli P., Terzi V., Delogu G. Barley-*Pyrenophora graminea* interaction: QTL analysis and gene mapping. Plant Breed. 1999;118(1):29-35. DOI 10.1046/j.1439-0523.1999.118001029.x.
- Peukert M., Weise S., Röder M.S., Matthies I.E. Development of SNP markers for genes of the phenylpropanoid pathway and their association to kernel and malting traits in barley. BMC Genet. 2013;14:97. DOI 10.1186/1471-2156-14-97.
- Reddivari L., Vanamala J., Chintharlapalli S., Safe S.H., Miller Jr J.C. Anthocyanin fraction from potato extracts is cytotoxic to prostate cancer cells through activation of caspase-dependent and caspase-independent pathways. Carcinogenesis. 2007;28(10):2227-2235. DOI 10.1093/carcin/bgm117.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic. Biol. Med. 1996;20(7):933-956. DOI 10.1016/0891-5849(95)02227-9.
- Robertson D.W. Inheritance in barley. Genetics. 1933;18(2):148-158.
- Rohde W., Barzen E., Marocco A., Schwarz-Sommer Z., Saedler H., Salamini F. Isolation of genes that could serve as traps for transposable elements in *Hordeum vulgare*. Okayama, Barley Genetics V. Proc. 5th Int. Barley Genet. Symp. (Eds. S. Yasuda, T. Konishi). Okayama, 1987;553-541.
- Rohde W., Dörr S., Salamini F., Becker D. Structure of a chalcone synthase gene from *Hordeum vulgare*. Plant Mol. Biol. 1991;16:1103-1106.
- Shoeva O.Y., Kukoeva T.V., Börner A., Khlestkina E.K. Barley *Ant1* is a homolog of maize *C1* and its product is part of the regulatory machinery governing anthocyanin synthesis in the leaf sheath. Plant Breed. 2015;134:400-405. DOI 10.1111/pbr.12277.
- Shoeva O.Y., Mock H.P., Kukoeva T.V., Börner A., Khlestkina E.K. Regulation of the flavonoid biosynthesis pathway genes in purple and black grains of *Hordeum vulgare*. PLoS ONE. 2016;11(10):e0163782. DOI 10.1371/journal.pone.0163782.
- Stratthearn K.E., Yousef G.G., Grace M.H., Roy S.L., Tambe M.A., Ferruzzi M.G., Wu Q.L., Simon J.E., Lila M.A., Rochet J.C. Neuroprotective effects of anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts in cellular models of Parkinson's disease. Brain Res. 2014;1555:60-77. DOI 10.1016/j.brainres.2014.01.047.
- Strygina K.V., Börner A., Khlestkina E.K. Identification and characterization of regulatory network components for anthocyanin synthesis in barley aleurone. BMC Plant Biol. 2017;17(1):184. DOI 10.1186/s12870-017-1122-3.
- Szajdek A., Borowska E.J. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review. Plant Foods Hum. Nutr. 2008;63:147. DOI 10.1007/s11130-008-0097-5.
- Tarakhovskiy Yu.S., Kim Y.A., Abdrasilov B.S., Muzaffarov E.N. Flavonoidy: biokhimiya, biofizika, meditsina [Flavonoids: biochemistry, biophysics, medicine]. Pushchino: Synchrobook Publ., 2013. (in Russian)
- The International Barley Genome Sequencing Consortium. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. Nature. 2012;491:711-717. DOI 10.1038/nature11543.
- Vihorev A.V., Strygina K.V., Khlestkina E.K. Identification and analysis of genes flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase in the barley genome. Materialy 4-j Mezhdunarodnoj konferencii "Genofond i selekciya rastenij". Novosibirsk, 4-6 aprelya 2018 g. [Proceedings of the 4th International Conference "Gene pool and plant breeding". Novosibirsk, April 4-6, 2018]. Novosibirsk: ICG SB RAS Publ., 2018;79-83. (in Russian)
- von Wettstein D. From analysis of mutants to genetic engineering. Annu. Rev. Plant Biol. 2007;58:1-19. DOI 10.1146/annurev.arplant.58.032806.104003.
- Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. Plant Physiol. 2001;126(2):485-493. DOI 10.1104/pp.126.2.485.
- Wise R.P., Rohde W., Salamini F. Nucleotide sequence of the *Bronze-1* homologous gene from *Hordeum vulgare*. Plant Mol. Biol. 1990;14(2):277-279.
- Woodward R.W. Inheritance of melanin-like pigment in the glumes and caryopses of barley. J. Agric. Res. 1941;63:21-28.
- Woodward R.W. Linkage relationships between the allelomorphous series, B, B^{mb}, B^g, and A₁a₁ factors in barley. J. Am. Soc. Agron. 1942;34:659-661.
- Woodward R.W., Thieret J.W. A Genetic study of complementary genes for purple lemma, palea, and pericarp in barley (*Hordeum vulgare* L.). Agron. J. 1953;45(5):182-185.
- Youdim K.A., Qaiser M.Z., Begley D.J., Rice-Evans C.A., Abbott N.J. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. Free Radic. Biol. Med. 2004;36(5):592-604. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.023.
- Zhou X., Chao M., Liang X. Screening and testing of barley varieties for scab resistance (in Chinese with English abstract). Acta Phytophylacica Sin. 1991;18:261-265.